

Литература

1. Davis K.L., Martin E., Turko I.V. and Murad F. (2001) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 203-236.
2. Wink D.A., Darbyshire J.F., Nims R.W. (1993) *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 23-27.
3. Ingarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8103-8107.
4. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1620-1624.
5. Czapski G. and Goldstein S. (1995) *10-International Congress of Radiation Research. Congress Lecture*, Vol. 2: (Hagen U., Harder D., Jung U., Streffer C. eds.) Wurzburg, Germany, pp. 228-232.
6. Huie R.E. and Padmaja S. (1993) *Free Rad. Res. Comms.*, 18, 195-199.
7. Степура И.И., Адамчук Р.И., Степура А.И. *Биофизика* (2002), т. 47, № 6, с. 903-913.
8. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. (1981) *Основы биохимии*, Мир, Москва, т. 3.

КОРРЕКЦИЯ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ: РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЕГО ДЕЙСТВИЯ

Беляева Л.Е., Шебеко В.И., Солодков А.П.

Государственный медицинский университет, г. Витебск

N-acetylcysteine is a thiol-containing drug with antioxidant capacity, widely used in pulmonology. Nevertheless, N-acetylcysteine (NAC) has a number of other unique properties. When infused in the blood, NAC is rapidly “ingested” by endotheliocytes and altered their reduced/oxidized glutathione ratio by stimulating glutathione synthesis. The ratio between reduced and oxidized glutathione is thought to be a “switcher”, determining redox-state and cellular response to different stimuli acting on cells. Moreover, NAC can influence both constitutive and inducible NO-synthase activity. In addition to this action, NAC can affect L-arginine transport into endothelium. This agent also can change bioavailability of nitric oxide and cause formation of S-nitrosothiols. These data indicate that NAC may be useful in the correction of oxidative and nitrosative stress which lead to endothelial dysfunction.

Our group have received results demonstrating that NAC influenced endothelium-depending coronary vessels' tone dysregulation following severe posthemorrhagic arterial hypotension. NAC (40 mg/kg, intraperitoneally) diminished excessive shear-stress induced coronary vasodilatation and reduced the

volume velocity of coronary flow after hemorrhage. This agent also almost completely prevented NO₃-/NO₂- elevation in the blood serum after hemorrhage. NAC significantly increased survival rate of animals belonging to the "hemorrhage" group. Hence, N-acetylcysteine may have advantages in the treatment of endothelial dysfunction observed not only after hemorrhage, but in a wide range of diseases.

«Окислительный стресс», возникающий в эндотелиоцитах при нарушении баланса между оксидантами и антиоксидантами, может являться одной из важнейших причин дисфункции этих клеток [12]. При этом изменяется не только способность эндотелиоцитов участвовать в регуляции сосудистого тонуса, но также стимулируется пролиферация гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, и эндотелиальные клетки приобретают провоспалительный фенотип [12]. Учитывая исключительную важность «окислительного стресса» в изменении функциональных свойств эндотелия, логично предполагать, что вещества со свойствами антиоксидантов могут использоваться для профилактики и коррекции дисфункции эндотелия. Среди всех известных антиоксидантов, которые могут использоваться с этой целью, особый интерес представляет N-ацетилцистеин (N-АЦ), препарат, хорошо известный в пульмонологической практике. Это вещество имеет исключительно интересные свойства, указывающие на то, что его рассмотрение просто как тиолсодержащего антиоксиданта кажется несколько упрощенным.

Возможность применения N-АЦ для профилактики и коррекции дисфункции эндотелия обусловлена в первую очередь тем, что при попадании N-АЦ в кровоток, он быстро «поглощается» эндотелиоцитами, деацилируется, превращается в цистеин и используется для синтеза глутатиона [8]. Благодаря наличию в его структуре свободной SH-группы, N-АЦ является «скавенджером» активных форм кислорода, особенно - гидроксильного радикала и гипохлорной кислоты [8], а также участвует в реакциях обмена сульфгидрильных групп.

Дальнейшее обсуждение возможности использования N-АЦ для коррекции дисфункции эндотелия требует краткого рассмотрения вопроса о роли активных форм кислорода в процессах жизнедеятельности клетки.

Сравнительно недавно появилась концепция об участии АФК в процессах редокс-регуляции клеточных функций, то есть регуляции посредством окисления – восстановления специфических сульфгидрильных групп протеинов, или «редокс-сенсоров», с образованием производных сульфеновой, сульфиновой и сульфоновой кислот, а также дисульфидных связей [2,15]. Активные формы азота через реакции S-нитрозилирования цистеиновых остатков протеинов также способны взаимодействовать с «редокс-сенсорами» [2]. Окисление или нитрозилирование «редокс-сенсоров» протеинов сопровождается

изменением их функций [10]. Список редокс-чувствительных соединений постоянно расширяется. К ним относят NO-синтазы, циклооксигеназу-2, эндотелин-1, киназы, белки теплового шока, факторы транскрипции, молекулы адгезии, тиоредоксин, рецептор трансферрина, факторы роста, ионные каналы, протоонкогены c-fos, c-jun, c-myc и их продукты, ферритин, гемоксигеназы, интерлейкины и др. [10]. Вступая в реакции обмена тиол-дисульфид, N-АЦ способен восстанавливать окисленные сульфгидрильные группы структурных и регуляторных белков и таким образом изменять их свойства.

Отметим, что «редокс-сенсорами» являются только наиболее чувствительные к окислению тиоловые группы различных протеинов, поскольку в нормально функционирующей клетке активность ее восстанавливающих систем (тиоредоксина, пероксиредоксинов, глутаредоксина) достаточно высока [2]. Восстанавливая окисленные сульфгидрильные группы «редокс-сенсоров», тиоредоксин, глутаредоксин и пероксиредоксины сами окисляются. Их регенерацию обеспечивают низкомолекулярные тиолы – цистеин, глутатион и тиоглицерол [2]. Вероятно, N-АЦ и/или цистеин способны активизировать регенерацию окисленного тиоредоксина, глутаредоксина и пероксиредоксинов в их восстановленные формы. Увеличение содержания последних может изменять степень окисления «редокс-сенсоров». В результате может изменяться протекание редоксзависимых внутриклеточных реакций.

Действие активных форм кислорода и азота может приводить к изменению редокс-состояния клетки (клеточного компартмента). Под редокс-состоянием клетки (компартмента) понимают соотношение в ней восстановленных и окисленных форм соединений (например, восстановленного и окисленного глутатиона, свободного НАДН и NAD^+ ; НАДФН и НАДФ $^+$) [15]. Редокс-потенциал сопряженных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в клетке, в соответствии с уравнением Нернста определяется восстанавливающей способностью субстратов этих редокс-пар и величиной «половинного восстановительного потенциала клетки». Величина же последнего значительным образом зависит от концентрации в клетке восстановленного глутатиона [15].

Соотношение между окисленным и восстановленным глутатионом (GSSG/GSH) является важнейшим параметром, определяющим редокс-состояние клеток [2]. Уменьшение содержания в клетке восстановленного глутатиона, часто с изменением соотношения GSSG/GSH наблюдается при «окислительном стрессе», а также при действии высоких концентраций активных форм азота [12,14]. При изменении соотношения GSSG/GSH в клетках изменяется характер активности целого ряда клеточных ферментов, факторов транскрипции, изменяется образование молекулярных шаперонов, функционирование ионных каналов и др. [2,10].

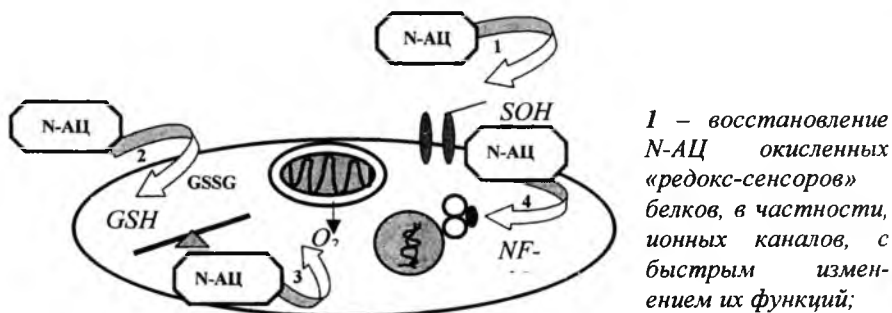
Более того, при последовательном изменении «половинного восстановительного потенциала клетки» от отрицательной до положительной величины «переключается поведение» клетки в направлении: пролиферация → дифференцировка → апоптоз → некроз [15]. Увеличение внутриклеточного содержания GSH под влиянием N-АЦ вследствие стимуляции синтеза GSH и его вытеснения из смешанных дисульфидов можно рассматривать в качестве еще одного важнейшего механизма действия N-АЦ, так как при этом может изменяться редокс-состояние эндотелиоцитов и характер их ответа на различные стимулы.

При длительном использовании N-АЦ, вероятно, взаимодействуя с Antioxidant Responsive Elements генов и изменяет их экспрессию [3]. Существуют данные и о том, что N-АЦ может регулировать посттрансляционный синтез ферритина и таким образом способен влиять на содержание внутриклеточного редокс-активного железа. В свою очередь, уровень редокс-активного железа определяет характер образования депонированных форм оксида азота, а также интенсивность образования активных форм кислорода и азота [1]. Это обстоятельство является еще одной важной предпосылкой, обосновывающей целесообразность использования N-АЦ для коррекции дисфункции эндотелия.

Образование и действие избыточных концентраций активных форм азота (NO , NO_2 , ONOO , N_2O_3 и их производных) определяют как «нитрозирующий стресс» (Stamler J.S., 1998). «Нитрозирующий стресс» является важнейшим патогенетическим механизмом, приводящим к нарушению регуляции сосудистого тонуса при различных формах патологии. N-АЦ способен влиять на интенсивность образования активных форм азота и ограничивать выраженность «нитрозирующего стресса» различными путями. Во-первых, он препятствует чрезмерной активации индуцированной и конституциональной изоформ NO -синтаз [6,11]. Предположительно, такое действие N-АЦ обусловлено его способностью защищать SH-группы в активном центре NO -синтазы от окисления АФК. N-АЦ также может изменять баланс между активностью тирозиновых протеинкиназ и фосфатаз – ферментов, ассоциированных с NO -синтазой. Возможно, именно этим механизмом объясняется обнаруженный нами феномен уменьшения выраженности «индуцированного потоком» эндотелийзависимого расслабления коронарных сосудов после острой кровопотери под влиянием N-АЦ [5]. Во-вторых, N-АЦ модулирует процессы транспорта в клетку L-аргинина [13] – основного субстрата NO -синтазной реакции. В-третьих, N-АЦ, так же, как и восстановленный глутатион, является «скавенджером» активных форм азота, в частности, NO и пероксинитрита, образуя с ними комплексы – S-нитрозотиолы, которые являются одной из форм «депо» оксида азота [1]. Следовательно, N-АЦ может изменять биодоступность оксида азота. В-четвертых,

введение N-АЦ быстро вытесняет NO из его физиологического «депо», с последующим снижением сосудистого тонуса. В-пятых, предположительно, N-АЦ может изменять тип молекулярных «мишеней» для оксида азота. Наконец, в-шестых, под действием N-АЦ в эндотелиоцитах может повышаться активность денитролазы, катализирующей реакцию превращения нитрозоглутатиона в глутатион-дисульфид. В результате изменения соотношения GSSG/GSH может видоизменяться характер ответа эндотелиоцитов на действие различных стимулов. Это еще один довод для теоретического обоснования возможности коррекции N-ацетилцистеином дисфункции эндотелиоцитов кровеносных сосудов при самых различных формах патологии.

В экспериментальных исследованиях эффективность использования N-АЦ уже подтверждена. Он традиционно используется в качестве «инструмента», позволяющего выявлять роль молекулярных механизмов редокс-регуляции в изменении функций различных клеток, в т. ч. и эндотелиоцитов. Спектр влияния N-АЦ может быть очень широким, включающим протеинкиназы, клеточные протоонкогены; гемоксигеназы; факторы транскрипции, интерлейкины; молекулы адгезии; рецепторы трансферрина, белки теплового шока [3,8] и др. N-АЦ изменяет характер функционирования ионных каналов, влияет на экспрессию Fas-лиганда, процессы образования ДНК и РНК, участвует в регуляции клеточного цикла [8]. Схематически характер действия N-АЦ на клетку представлен на рис.



2 – изменение редокс-состояния клеток и характера их ответа на действие патогена; 3 – инактивация активных форм кислорода и азота; 4 – изменение экспрессии различных генов через модификацию активности факторов транскрипции или посредством взаимодействия с Antioxidant Responsive Elements генов.

В настоящее время получены убедительные доказательства эффективности использования N-АЦ для предупреждения нарушения

механизмов эндотелийзависимой регуляции тонуса кровеносных сосудов при различных формах патологии. Так, предварительное введение N-АЦ при шоке, вызванном окклюзией спланхических артерий, предотвращает снижение сократительного ответа кольца аорты на норадреналин, а также улучшает эндотелийзависимое агонистиндуцируемое расслабление кольца аорты [9].

Нами изучено влияние N-АЦ на тонус коронарных сосудов изолированного сердца крысы и содержание вторичных продуктов деградации NO (нитратов/нитритов) в плазме крови после острой массивной кровопотери (дефицит ОЦК – приблизительно 44%). N-АЦ, введенный через 1 час после начала кровопускания (40 мг/кг внутривенно), препятствует выраженному ослаблению миогенного тонуса коронарных сосудов и увеличивает эффективность перфузии миокарда изолированного сердца крысы. Кроме того, N-АЦ уменьшает выраженность «индуцированного потоком» эндотелийзависимого снижения тонуса коронарных сосудов и практически полностью предупреждает прирост содержания нитратов/нитритов в плазме крови после кровопотери. Эти данные свидетельствуют о возможности эффективного влияния N-АЦ на эндотелийзависимые (NO-зависимые) механизмы регуляции тонуса коронарных сосудов при острой массивной кровопотере. Важно, что процент выживаемости крыс в условиях 2-часовой постгеморрагической артериальной гипотензии под влиянием N-АЦ увеличивается с 77,6 до 92,2 [5].

Установлено также, что N-АЦ предупреждает нарушение эндотелийзависимой вазодилатации у спонтанно-гипертензивных крыс [7] и восстанавливает NO-зависимое расслабление сосудов при экспериментальной сердечной недостаточности. В настоящее время уже предпринимаются попытки выяснить, когда и как можно использовать N-АЦ в кардиологической практике. Так, N-АЦ предполагается применять для устранения толерантности к нитровазодилаторам. В ходе недавно проведенного исследования было установлено, что введение N-АЦ в коронарное русло и в бедренную артерию добровольцев практически не изменяет исходный тонус этих сосудов, однако улучшает эндотелийзависимое расслабление как интактных артерий, так и артерий с признаками атеросклеротического поражения [4].

Таким образом, новые сведения о способности N-ацетилцистеина эффективно влиять на механизмы редокс-регуляции функций различных клеток указывают на необходимость разработки современных подходов к его использованию в клинической практике для коррекции дисфункции эндотелия кровеносных сосудов. При этом следует учитывать, что N-АЦ представляет собой не только «идеальный ксенобиотик», способный непосредственно влиять на биохимические процессы в клетках в

результате собственного метаболизма, но еще он не является токсичным и практически не накапливается в организме.

Литература

1. Шебеко В.И., Солодков А.П., Манухина Е.Б., Ванин А.Ф. Механизмы редокс-регуляции депонирования оксида азота в сердечно-сосудистой системе: гипотеза // Дисфункция эндотелия / Тр. II междунар. научно-практ. конф. – Витебск, 2002. – С. 48-54.
2. Шебеко В.И. Редокс-регуляция фенотипа эндотелиоцитов: от хаоса к порядку // Вестник БГМУ. – 2002. – Т.1, №1. – С. 30-38.
3. Allen R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation // Free Radic. Biol. Med. –2000.-Vol. 28, № 3.- P. 463-499.
4. Andrews N.P., Prasad A., Quyyumi A.A. N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function // J. Am. Coll. Cardiol.-2001.-Vol. 37, № 1.-P. 117-123.
5. Belyaeva L.Eu, Shebeko V.I., Solodkov A.P. N-acetylcysteine and immobilization stress attenuate dysregulation of the endothelium-dependent coronary vascular tone induced by acute hemorrhage // EDHF 2002 / Ed. by P. Vanhoutte. – Taylor & Francis. – P. 156-164.
6. Bergamini S., Rota C., Canali R. e. a. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase // Nitric Oxide. – 2001. –Vol. 5, № 4. – P. 349-360.
7. Cabassi A, Bouchard J.F., Dumont E.C. e.a. Effect of antioxidant treatments on nitrate tolerance development in normotensive and hypertensive rats // J. Hypertens.-2000.-Vol. 18, № 2.-p. 187-196.
8. Cotgreave I.A. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications // Adv. Pharmacol. – 1997. – Vol. 38. – P. 205-225.
9. Cuzzocrea S., Mazzone E., Costantino G. e.a. Effects of N-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury // Cardiovasc. Res.-2000.-Vol. 47, № 3.-P. 537-548.
10. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // physiol. Rev. – 2002. – Vol. 82, № 1. – P. 47-95.
11. Kampf C., Roomans G.M. Effect of hypochlorite on cultured respiratory epithelial cells. – Free Radic. Res. – 2001. –Vol. 34, № 5. – P. 499-511.
12. Lum H., Roebuck K.A. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction // Am. J. Physiol. –2001.-Vol. 280, № 4.-P. C 719-741.
13. Patel J.M., Abeles A.J., Block E.R. Nitric oxide exposure and sulfhydryl modulation alter L-arginine transport in cultured pulmonary artery

- endothelial cells // Free Radic. Biol. Med. –1996.– Vol. 20, № 5. – P. 629-637.
14. Patel R.P., McAndrews J., Sellak H e.a. Biological aspects of reactive nitrogen species // Biochim. Biophys. Acta.-1999.-Vol. 1411, № 2.-P. 323-333.
15. Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // Free Radic. Biol. Med.- 2001. – Vol. 30, № 11. – P. 1191-1212.

**ХРОНИЧЕСКАЯ БЛОКАДА ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ИЗОФОРМЫ
СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА ВОССТАНАВЛИВАЕТ
РЕАКТИВНОСТЬ ЛЕГОЧНЫХ И СИСТЕМНЫХ СОСУДОВ У
КРЫС С МОНОКРОТАЛИНОВОЙ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

**Бонарцев А.П., Славуцкая А.Т., Дьяконов К.Б., Постников А.Б.,
Медведева Н.А.**

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова

The pulmonary hypertension is characterized by dysfunction of endothelium and smooth muscular vessels . To study iNOS role in the pulmonary hypertension the special inhibitor iNOS- aminoguanidine (AG) is used. Alkaloid monocrotaline (60 mg/kg) have been injected to Wistar rats (180-200gr). NO production has been analyzed according to the circadian urinary nitrate/nitritis excretion (NOx).

NO production is elevated on the 7th day after injection – the elevated NOx excretion (312 nmol/d in MCT –K gr and 273 nmol/d in MCT –AG gr) in comparison with the initial level (17 and 13nmol/d, respectively) has manifested.

NOx excretion has increased on the 14th and 28th days after MCT injection (763 and 168 nmol/d in MCT – Kgr, respectively, in comparison with the initial level).

Chronic AG injection leads to iNOS blockade - the level of NOx excretion manifested on the 14th and 28th days after injection, there was no any difference from the initial one. In 4 weeks after in MCT injection pulmonary hypertension has developed in rats.

Chronic injection of AG leads to the partly rehabilitation of systole pressure in the right ventricle in MCT – AG p/gr (47 ± 7 mm Hg in comparison